

**Determinación de seropositividad contra 7 serovares de leptospira en caninos inmunizados con vacunas recombinantes y atenuadas en la ciudad de Pereira, Risaralda.**

**Determination of seropositivity against 7 serovars of leptospira in canines immunized with recombinant and attenuated vaccines in the city of Pereira, Risaralda.**

D. Diaz<sup>1</sup>, C. Cardona<sup>1</sup>; D. Latorre<sup>2</sup> 2019

<sup>1</sup> *Universidad Tecnológica de Pereira, Estudiantes Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad ciencias de la salud- Colombia*

<sup>2</sup> *Universidad Tecnológica de Pereira, Profesor auxiliar, dept. Ciencias Clínicas – Colombia*

**Palabras clave:**

Leptospirosis, serovares, recombinante, atenuada, microaglutinación.

**Resumen:**

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue determinar la seropositividad de 7 serovares de leptospira en caninos inmunizados con vacunas recombinantes y atenuadas.

Diseño experimental: Estudio descriptivo

Animales: 14 caninos (13 hembras y 1 macho) con edades comprendidas entre 6 meses y 1,5 años, sin inmunización previa.

Intervenciones: la sangre para la muestra se extrajo de las venas cefálica y yugular y se procesó en el sistema.

Resultados: Por medio de la técnica de microaglutinación, se observó que para los 14 perros vacunados era negativo sin presencia de titulación de anticuerpos para ambas vacunas. Determinar que ambas vacunas proporcionan la misma inmunidad.

Conclusiones:

Esta fue la razón para la determinación de la seropositividad frente a 7 serovares de leptospira en una población de caninos inmunizados con vacunas recombinantes y

atenuadas en la ciudad de Pereira, mediante el uso de una prueba de diagnóstico serológico conocida como Microaglutinación (MAT).

**Keywords:**

Leptospirosis, serovars, recombinant, attenuated, microagglutination.

**Abstract:**

Objective: The objective of this work was to determine the seropositivity of 7 serovars of leptospira in canines immunized with recombinant and attenuated vaccine.

Experimental design:

Animals: 14 canines (13 females and 1 male) aged between 6 months to 1.5 years, without prior immunization

Interventions: Blood for the sample was collected from the cephalic and jugular veins and processed in the system

Results: By means of the microagglutination technique it was observed that for the 14 vaccinated dogs it was negative without presence of antibody titration for both vaccines. Determining that both vaccines provide the same immunity

Conclusions:

This was the reason for the determination of seropositivity against 7 serovars of leptospira in a population of canines immunized with recombinant and attenuated vaccines in the city of Pereira, through the use of a serological diagnostic test known as Microagglutination (MAT).

**Abreviaciones:**

MAT: Técnica de microaglutinación

## Introducción

*Leptospira* es un género que corresponde a la familia Leptospiraceae, orden Spirochaetales, la especie consta de distintos serogrupos que se pueden adaptar a diferentes condiciones ambientales. El género *Leptospira* se divide en 21 subespecies estudiadas (1); que a su vez se lo componen en dos grupos uno infeccioso y otro no infeccioso. El infeccioso lo conforman dos subgrupos, uno patógeno que está conformada por 9 especies y otro denominado como patógeno intermedio que comprende 5 especies y el grupo no infeccioso, que incluye las no patógenas o saprófitas que tiene 6 especies, (2)

Los roedores y otras especies de animales silvestres son los principales reservorios de leptospira, contaminando el ambiente por medio de la orina y excretas lo cual representa una fuente primaria de infección afectando comúnmente a caninos, bovinos, equinos, porcinos y ser humano (3). Actualmente existen dos serovares de *Leptospira interrogans* que afectan frecuentemente a los caninos los cuales son *Leptospira canicola* y *Leptospira Icterohaemorrhagiae*; aunque recientemente se han presentado otros serovares afectando a los caninos como lo son el *Grippityphosa*, *Pomona*, *Bratislava* y *Autumnalis* (4).

La Leptospirosis se asocia comúnmente con lesión renal aguda, disfunción hepática, pulmonar y ocasionalmente una enfermedad hemorrágica (5). La infección se presenta con más frecuencia en las membranas mucosas del ojo, la boca, la nariz y el tracto genital. Existe un período de bacteriemia que dura aproximadamente una semana, presentando signos a los dos primeros días pos infección (6). Para su diagnóstico existen diferentes métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de leptospira en suero, orina, líquido cefalorraquídeo y tejido de autopsia (7), La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la más eficiente pero de diagnóstico más lento y por último la prueba amplificación isométrica (LAMP) que consiste en un método alternativo de amplificación de ADN (8).

Para su tratamiento los medicamentos de elección son la doxiciclina, estreptomicina, cefalosporinas y penicilina siendo la última el tratamiento con mayor eficacia sobre la enfermedad (9).

## ***Vacunas***

Son suspensiones de microorganismos vivos, inactivos o muertos, fracciones de los mismos o partículas, que al ser administrados inducen una respuesta inmune que previene la enfermedad contra la que está dirigida (10). Las vacunas forman una de las medidas sanitarias en las que se ha dado un beneficio muy alto contra distintas enfermedades que causaban grandes epidemias y muertes; las vacunas no solo favorecen a los animales vacunados, también a los no vacunados susceptibles que viven en su entorno (11). En cuanto su clasificación las vacunas se pueden dividir de distintas formas microbiológicamente, se dividen en víricas y bacterianas con una subdivisión de vivas o atenuadas y muertas o inactivas (12).

Las primeras vacunas tenían un componente sencillo, provenían de agentes naturales que eran cultivados, y atenuados, de diferentes maneras, primero ensayaban en animales de experimentación hasta que se observaba que había perdido su grado de patogenicidad, pero conservando la inmunogenicidad. El desarrollo era extenso ya que podía tardar años en tener una modificación, luego empezaron a experimentar con vacunas inactivadas donde se utilizaron antígenos y otros componentes como conservante (13).

## ***Tipos de vacunas***

### **Vacunas atenuadas**

Las vacunas atenuadas están conformadas por microorganismos que pueden replicar en el huésped muy parecido a la del microorganismo originario, en la que se genera una infección mínima y con síntomas muy leves (14). Normalmente una dosis única ofrece una protección para toda la vida, aunque no siempre es así ya que en algunos casos se aplica una segunda dosis para no contar con fallos de la primera vacunación (15). Las vacunas atenuadas tienen como ventaja un alta (16).

## **Vacunas Inactivadas**

Las vacunas inactivadas o también llamadas muertas están formadas por microorganismos inactivados que se encuentran en fracciones o subunidades, lo que hace que su reproducción no sea posible de manera que no se produce la enfermedad (14). Las vacunas inactivadas provocan una respuesta inmunitaria más baja y de corto plazo comparado con las vacunas atenuadas. La primera dosis no genera inmunidad protectora solo capacita el sistema inmunológico para las siguientes dosis que es donde aparece la protección (16), otro aspecto a tener en cuenta es que las vacunas inactivadas tienen una respuesta principalmente humoral (17).

## **Vacunas de subunidades**

Las vacunas de subunidades contienen un componente de subunidades antigénicas que pueden ser de diferentes formas como lipopolisacáridos, extractos ribosómicos, o proteínas purificadas o sintetizadas químicamente (18).

## **Vacunas recombinantes**

Son vacunas que se elaboran ubicando el gen que codifica el antígeno en el genoma del huésped ya sea levadura, bacteria o virus (13). Estas vacunas son muy reconocidas en todo el mundo presentándose como uno de los avances científicos más representativos dentro del campo de la biotecnología. La práctica de recombinar fracciones determinadas de ADN de un organismo, del tamaño de un gen y trasladarlos a otro por medio de un vector o plásmido de ADN, ha llevado a la creación de nuevas vacunas. Además, las vacunas recombinantes brindan una respuesta inmune dirigida con buena eficacia y seguridad lo que impide inyectar a los pacientes organismos enteros, inactivados o modificados; por otro lado, la

ausencia de adyuvantes permite reducir reacciones secundarias ligadas a las vacunas.

En medicina veterinaria se conocen tres tipos de vacunas recombinantes que son propias de animales de compañías reconocidas por el Departamento de Agricultura de E.U.A. (USDA), vacuna de subunidades, vacuna con remoción de genes y vacunas con vector viral, aunque no existen vacunas con remoción de genes aprobadas para utilizar en animales de compañía (19).

## **Materiales y métodos**

Los pacientes ingresados al estudio contaron con el consentimiento informado de los propietarios.

El trabajo se realizó en la vereda la cucaracha del municipio de Pereira, Risaralda. La recolección de las muestras se hizo en el albergue Sara Reyes de la ciudad mencionada y la prueba se realizó en el laboratorio Dr. Carlos López de la ciudad de Cali. Para el trabajo se recolectaron 14 muestras de suero sanguíneo de pacientes caninos seleccionados al azar de una población en riesgo entre 6 meses a 1.5 años de edad, sin importar su raza o sexo.

Los caninos se dividieron en dos grupos aleatoriamente. Un grupo se inmunizó con la vacuna viva atenuada de la empresa Virbac (Canigen séxtuple MHA2PPi/LR) y el otro grupo con la recombinante de Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira); ambos grupos estaban sin vacunación previa. Luego de dos meses a cada paciente se le tomó muestras de sangre por venopunción de la vena cefálica o vena yugular que fueron depositadas en tubos vacutainer tapa roja para después ser almacenadas en una gradilla y posteriormente ser refrigeradas para su análisis, el cual se realizó por medio de la técnica (MAT) y se trabajó con 7 serovares de *Leptospira interrogans*: *canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *bratislava*, *grippotyphosa*, *hardjo bovis* y *prajitno*. Así se determinó la titulación de anticuerpos que presentó cada paciente.

## **Técnica MAT**

La prueba utilizada para el diagnóstico serológico de la Leptospirosis es MAT (Prueba de Aglutinación Microscópica), donde el suero del paciente reacciona con suspensiones de antígenos vivos de distintos serovares de leptospira. Después de la incubación, las mezclas de suero y antígeno se observan en el microscopio para ver la aglutinación, y así determinar los títulos (20).

La prueba MAT en la que se emplean antígenos vivos es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Constituye la prueba de referencia frente a la que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para la importación/exportación. La especificidad de la MAT es buena; normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con Leptospira de manera significativa. Sin embargo, existen reacciones serológicas cruzadas significativas entre serotipos y serogrupos de Leptospira y es probable que un animal infectado con un serotipo tenga anticuerpos frente al serotipo infectante que dé una reacción cruzada con otros serotipos (normalmente a un nivel más bajo) en la MAT. (23)

## **Procedimiento analítico.**

1) Las estirpes seleccionadas deben cultivarse en medio de cultivo líquido para leptospira (como EMJH u otro medio adecuado) a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  y el cultivo debe tener al menos 4 días, pero no más de 8. Como antígenos se usan cultivos vivos con densidades aproximadas a  $2 \times 10^8$  leptospira por ml. La densidad del cultivo puede estimarse contando directamente las células en una cámara de recuento de bacterias en un microscopio de campo oscuro. Alternativamente, la densidad celular se puede establecer midiendo la transmitancia en un espectrofotómetro con filtro a 400 nm o por nefelometría. Si se emplean métodos indirectos, se debe correlacionar el número de células bacterianas con las lecturas del instrumento específico empleado.

II) El número de antígenos que se utilizan es determinado, y se puede realizar una selección con una dilución del suero de 1/50 (o una dilución de inicio diferente basada en el objetivo de la prueba).

III) A cada pocillo se añade un volumen de cada antígeno, igual al volumen del suero diluido, para hacer una dilución final del suero de 1/100 en la prueba de selección.

IV) Las placas de microtitulación se incuban a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $1\frac{1}{2}$  –4 horas

V) Las placas se examinan mediante microscopía de campo oscuro. El título de punto final se define como la dilución de suero que muestra un 50% de aglutinación, dejando libres un 50% de las células en comparación con un cultivo control diluido a la mitad en solución salina tamponada con fosfato. El resultado de la prueba puede indicarse como el punto final de la dilución del suero (por ejemplo, como 1/100 o 1/400) o como un título que es el inverso de la dilución del punto final del suero (por ejemplo, 100 o 400) (21).

### **Diseño experimental**

Se realizó un estudio descriptivo en función de la seropositividad que presentaron ambas vacunas contra leptospira en caninos.

### **Análisis estadístico**

Se hará un análisis de medianas, rangos, promedios y desviación estándar según las muestras, distribución normal o no.

### **Resultados**

Para ambos grupos de caninos, encontramos que no hubo diferencias que nos indiquen que las vacunas recombinantes son más eficaces que las atenuadas.



Tabla 1.

Nombre del paciente	Tipo de biológico	Peso (kg)	Edad (Meses)
Susanita	Virbac (Canigen séxtuple)	7	8
Dulcinea	Virbac (Canigen séxtuple)	4	10
Jack	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8	7
Kahomy	Virbac (Canigen séxtuple)	3	8
Natividad	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	2	11
Brisa	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	9	15
Gia	Virbac (Canigen séxtuple)	7	18
Kiara	Virbac (Canigen séxtuple)	6	16
Shakira	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	4	14
Dakota	Virbac (Canigen séxtuple)	5	11
Martina	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	3	9
Sasha	Virbac (Canigen séxtuple)	7	6
Brandy	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	11	8
Dulce	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8	12

Tabla 2. Resultados prueba de Microaglutinación

	Leptospira Microaglutinación
L. pomona	Negativa
L. hardjo bovis	Negativa
L. hardjo prajitno	Negativa
L. canicola	Negativa
L. icterohaemorrhagiae	Negativa
L. grippotyphosa	Negativa
L. bratislava	Negativa

Numero 1

Nombre del paciente	Tipo de biológico	Peso (kg)	Edad (Meses)
Susanita	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	8
Dulcinea	Virbac (Canigen séxtuple)	4,00	10
Jack	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8,00	7
Kahomy	Virbac (Canigen séxtuple)	3,00	8
Natividad	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	2,00	11
Brisa	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	9,00	15
Gia	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	18
Kiara	Virbac (Canigen séxtuple)	6,00	16
Shakira	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	4,00	14
Dakota	Virbac (Canigen séxtuple)	5,00	11
Martina	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	3,00	9
Sasha	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	6
Brandy	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	11,00	8
Dulce	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8,00	12
Media		6,00	10,93
desvesta		2,601774542	3,647217817
Error estandar		1,362867807	1,910494421
Min		2,00	6,00
Max		11,00	18,00

Numero 2

Nombre del paciente	Tipo de biológico	Peso (kg)	Edad (Meses)
Jack	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8,00	7
Natividad	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	2,00	11
Brisa	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	9,00	15
Shakira	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	4,00	14
Martina	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	3,00	9
Brandy	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	11,00	8
Dulce	Recombitek C6 (Séxtuple con leptospira)	8,00	12
Susanita	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	8
Dulcinea	Virbac (Canigen séxtuple)	4,00	10
Kahomy	Virbac (Canigen séxtuple)	3,00	8
Gia	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	18
Kiara	Virbac (Canigen séxtuple)	6,00	16
Dakota	Virbac (Canigen séxtuple)	5,00	11
Sasha	Virbac (Canigen séxtuple)	7,00	6
Promedio	6,43	10,86	
Desvesta	3,40867241	3,02371578	
Error estandar	2,52513346	2,23995884	
Min	2,00	7,00	
max	11,00	15,00	
Promedio	5,57	11,00	
Desvesta	1,61834719	4,43471157	
Error estandar	1,19886634	3,28521993	
Min	3,00	6,00	
max	7,00	18,00	

Grupo	Variable	Media	desvesta	Error estandar	Min	Max	Positividad
Virbac	Edad (años)	6,4	3,4	2,5	2,0	11,0	0%
	Peso (Kg)	10,9	3,0	2,2	7,0	15,0	
Recombitek	Edad (años)	5,6	1,6	1,2	3,0	7,0	0%
	Peso (Kg)	11,0	4,4	3,3	6,0	18,0	
Total	Edad (años)	6,0	2,6	1,4	2,0	11,0	0%
	Peso (Kg)	10,9	3,6	1,9	6,0	18,0	

No hay diferencia entre las vacunas respecto a la positividad

## Discusiones

- Según lo hallado en la literatura dice que las vacunas recombinantes brindan una mayor inmunización que las atenuadas, pero en los resultados obtenidos en este trabajo al parecer el efecto es el mismo.
- Lo que la tecnología recombinante pone sobre la mesa, que las vacunas convencionales no hacen, se puede describir como una respuesta inmune dirigida, eficaz y con una seguridad sin precedentes. (22)

## Conclusiones

- Las vacunas demostraron tener la misma eficacia antigénica sin diferencia de raza, edad o sexo.
- El estado nutricional aunque era diferentes en todos los pacientes, no influyó para que se presentaran efectos adversos por parte de las vacunas.
- Se recomienda que los perros sean inmunizados entre los 5 y 12 meses de

edad y preferiblemente que se tenga un registro previo de vacunación.

- Debe mejorarse la disponibilidad de las pruebas por parte de los laboratorios en Colombia.
- Los resultados obtenidos en este trabajo podrían utilizarse como referencia para futuros estudios y medidas de prevención y control por parte de las autoridades sanitarias y el gremio veterinario en general.

## ***Bibliografía***

1. Monti G. Leptospirosis in dogs and cats : epidemiology , clinical disease , zoonotic implications and prevention Leptospirosis en caninos y felinos domésticos : epidemiología , enfermedad clínica , implicaciones zoonóticas y prevención. 2014;348:337–48.
2. Romero-vivas CM, Falconar AK. Leptospira spp . and human leptospirosis. Salud Uninorte. 2016;32(1):123–43.
3. Gualtieri CAS, Carlín C, Peralta I, Peirone C, Gattarello V, Marc L, et al. Evaluación clínica, bioquímica y hematológica de caninos seropositivos a

- distintos serovares de *Leptospira interrogans*. InVet [Internet]. 2012;14(2):131–9. Available from:  
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1668-34982012000200001&lang=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982012000200001&lang=es)
4. Era SGL, Passarob D, , Luis Samartinoa, c AS, Romeroa G, Brihuegaa B. Genotypes of *Leptospira* spp. strains isolated from dogs in Buenos Aires, Argentina. 2014;46(3):201–4.
  5. Barth A, Magnin M, Hugonnard M. Hemorrhagic, hemostatic, and thromboelastometric disorders in 35. 2016;
  6. Adler B. Current Topics in Microbiology and Immunology and Leptospirosis. 2015. 6,7, 12-15, 21-37.
  7. Sengupta M, Kundavaram A, Prabhakar P, Satyendra S, Thambu D, Abraham OC, et al. Utility of Loop-mediated Isothermal Amplification Assay, Polymerase Chain Reaction, and ELISA for Diagnosis of Leptospirosis in South Indian Patients. 2017;1–5.
  8. Chen H-W, Weissenberger G, Atkins E, Chao C-C, Suputtamongkol Y, Ching W-M. Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Leptospira*. Int J Bacteriol [Internet]. 2015;2015:147173. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4745460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  9. Naing C, Reid SA, Aung K. Comparing antibiotic treatment for leptospirosis using network meta-analysis: a tutorial. BMC Infect Dis [Internet]. 2017;17(1):29. Available from:  
<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-2145-3>
  10. Organización Panamericana de la Salud. Introducción e implementación de nuevas vacunas. Guía práctica. Publicación Científica y Técnica N°632. 2009. 3-11 p.

11. Jiménez Y, Rendón J. Pasado, presente y futuro de las vacunas. *Cienc Salud* [Internet]. 2013;2(5):11–20. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1576988701702476>
12. Álvarez García F. Características generales de las vacunas. *Pediatr Integr*. 2011;15(10):899–906.
13. Blanco Quirós A. Actualización sobre vacunas y nuevas perspectivas. *An la Real Acad Med y Cirugía Valladolid*, ISSN 0210-6523, Nº 51, 2014, págs 141-158. 2014;(51):141–58.
14. Gonzalez Hachero J, Perez Quintero JA. Clasificación de las vacunas. *Asoc española vacunología*. 2005;1–9.
15. Comité Asesor de Vacunas. Generalidades de las vacunas. *Asoc Española Pediatr* [Internet]. 2013;1–8. Available from: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-1>
16. De C, Martínez MPA, Ramón J, Pardo DJ, Codes G De. Conceptos generales. *Calendarios de vacunación sistemática del niño y del adulto en España. Impacto de los programas de vacunación*. 2015;33(1):58–65.
17. Hamborsky J, Kroger A WS. *Epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases*. 13th ed. Public Health Foundation, editor. Washington D.C.; 2015. 1-8 p.
18. López M, Mallorquín P, Pardo R, Miguel V. Vacunas de nueva generación. *Informe de Vigilancia Tecnológica. Genoma Esp, Salud Hum*. 2004. 114 p.
19. Carolina N. *La tecnología de Vacunas recombinantes*. 2017. p. 1–2.
20. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2001 Apr [cited 2015 Aug 12];14(2):296–326.
21. Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. (2000). *Leptospira and Leptospirosis*, Second Edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.

22. Ford, R.B (2004) “La tecnología de vacunas recombinantes” InfoMerial.  
Información técnica para el médico veterinario.

23. Manual OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Sección Leptospirosis